

生命機能解明を志向した複合糖質有機合成化学

著者	眞鍋 史乃
雑誌名	星薬科大学紀要
号	62
ページ	59-66
発行年	2020-12-10
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000852/

生命機能解明を志向した複合糖質有機合成化学

眞 鍋 史 乃

星薬科大学 機能分子創成化学研究室

Glycochemistry reveals biological functions of glycoconjugates

Shino MANABE

Laboratory of Functional Molecule Chemistry, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University

はじめに

糖鎖は、核酸、タンパク質と並ぶ生体高分子である。糖鎖は、主に細胞表面の糖脂質やタンパク質の翻訳後修飾体として存在しており、タンパク質品質管理機構、細胞接着、感染、免疫、シグナル伝達に関与している。さらに、病態により糖鎖構造が変化することも明らかになっている¹⁻⁴⁾。生化学研究や疾患の治療と予防に関する研究では、これら糖鎖構造を適切に見極め、理解することが不可欠である。そのためには、均一構造の糖鎖、複合糖質の十分量の研究試料が必要である。核酸やタンパク質は、分子生物学の発展により、増幅や合成による均一試料の調製が可能であるが、糖鎖や複合糖質は分子生物学による均一試料の調製は困難である。なぜなら、糖鎖生合成経路は、セントラルドグマの外にあり、複数の糖転移酵素と糖加水分解酵素により生合成される結果、糖鎖や複合糖質は、微小構造が少しずつ異なる一群の化合物群となるからである。さらに、糖鎖、および複合糖質は、微小構造が異なることから物理化学的性質が似ており、自然界においての存在量も微量であることから単離精製することも困難である。

セントラルドグマ外にあり、生合成に複数の酵素が関与する点で、糖鎖は二次代謝物とも位置付けられる。アルカロイドやテルペンなどの二次代謝物の合成と供給は、有機合成化学によって行われてきた。これらのことを背景とすると、糖鎖や複合糖質の合成や供給も有機合成化学の対象であることは、当然のことでもある。

核酸やペプチドは、それらの構造が直鎖状であること、ユニット同士の結合反応においての収率が高いこと、立体制御の必要もないことから、化学合成も進歩しており、すでに自動合成が達成されるに至っている。生化学者は、受託サービスに申し込めば、研究を遂行するための核酸やペプチドを入手することができる。一方、糖鎖は分岐構造を持つこと、ユニットを連結する反応において立体

化学制御が必要であることなどから、その合成は、いまだ発展途上である。糖鎖合成化学は、この20年で著しく進展してきたものの、いまだ糖鎖や複合糖質を合成できるのは、世界的にもごく一部の化学者に限られる。我々は、有機合成を基盤として、糖鎖、複合糖質を合成し、生化学研究と協同して生命現象解明を目指している。本稿では、我々の成果の一端を紹介する。

1. C-マンノシルトリプトファンの同定と全合成研究

半数以上のタンパク質は、翻訳後修飾として糖鎖修飾を受けている。タンパク質糖鎖修飾は、糖鎖とタンパク質がアスパラギン側鎖アミド基を介して結合した N-結合型糖鎖と、セリン/スレオニンの水酸基を介して糖鎖とタンパク質が結合した O-結合型糖鎖に大別されている (Fig. 1)⁵⁾。一方、1994年にマンノースとトリプトファンが炭素-炭素結合を介して結合した C-結合型糖鎖が RNase 中に見出された⁶⁾。一旦その存在が同定されると、C-Man-Trp はエボラウイルスからヒトまで広く存在していることが明らかとなっている⁷⁾。1994年まで C-Man-Trp が未知であった理由として、主に 2 つの理由が考えられる。ひとつは、C-Man-Trp が強酸性条件の Edman 分解において壊れるためである。もうひとつは、近年趨勢を極めている MS 解析では、あらかじめソフトウェアにルーチン解析作業が組み込まれているので、新規構造が見出しにくいからである。マンノシル化を受けるタンパク質側の recognition sequence は Trp-Xaa-Xaa-Trp/Phc/Cys (Xaa は任意のアミノ酸) であること^{8,9)} や生合成においてドリコールリン酸マンノースを供与体とすることも報告された¹⁰⁾。特に thrombospondin type I repeat (TSR) superfamily や cytokine receptor type I family では thrombospondin type I repeat と呼ばれる部位が C-マンノシル化されることが多い。Thrombospondin type I repeat ではマンノシル化される位置にあるトリプトファンが他のアミノ酸に置換されると、相互作用するタンパ

ク質との結合が弱くなることなどが報告されている。これらのことから *C*-マンノシル化が生体内において何らかの機能を持っていることが示唆される。これらのことを背景として、供給が困難である *C*-Man-Trp の有機化学による合成を行った。

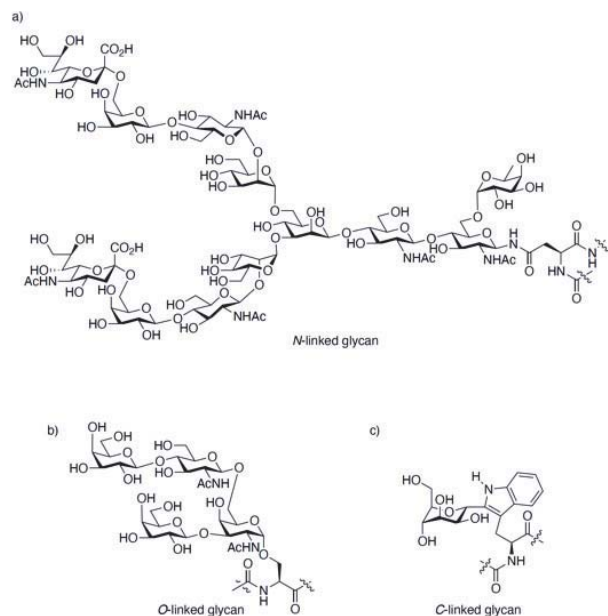


Fig. 1 タンパク質糖鎖修飾構造：a) *N*-結合型糖鎖の一例；b) *O*-結合型糖鎖の一例；c) *C*-結合型糖鎖 **C-mannosyl tryptophan**

まず、1,2-anhydromannose とリチオ化されたトリプトファン誘導体を用いて、炭素-炭素を結合した (Fig. 2)¹¹⁾。その後、水酸基のカルボン酸への酸化反応と保護基の除去を行う事により、短工程、高収率で *C*-Man-Trp を得ることができた。合成した *C*-Man-Trp は、炭素結合でピラノシドと結合していることやインドールの高高さのため、反転した椅子型配座をとることも ¹H-NMR のカップリング定数より確認された。生命機能解明を目的として、合成した *C*-Man-Trp に蛍光ラベル化、ビオチン化などの化学修飾や *C*-Man-Trp を含むペプチドなどの合成を行った。なお、我々の合成達成と同時期に西川らにより、シリル保護アセチレンを用いた立体選択的 *C*-グ

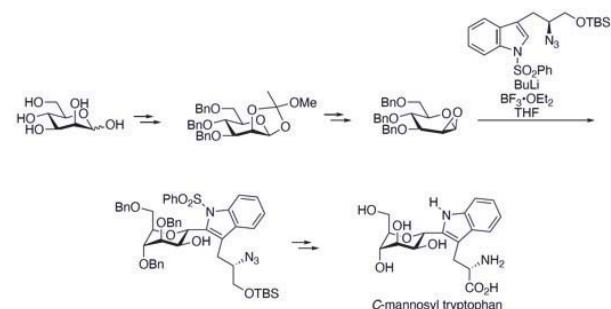


Fig.2 **C-Man-Trp** の合成スキーム

リコシル化、菌頭反応、Castro インドール合成を鍵反応とした合成が達成されている¹²⁾。

2. 合成 *C*-マンノシルトリプトファンに基づいた病態との関係を明らかにする生化学研究

さて、合成した *C*-Man-Trp を標品として、HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) カラムを用いた UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) 解析により *C*-Man-Trp を検出する系を構築した。その結果、マウスでは、*C*-Man-Trp の存在量が臓器によって異なり¹³⁾、脳や肺、生殖器官において高濃度で存在する一方、骨格筋や心臓で低濃度であることが明らかになった。さらに、糖尿病や卵巣癌などの病変により *C*-Man-Trp が上昇することが示された^{14, 15)}。特に、現在卵巣癌のバイオマーカーとして用いられている CA125 より高い AUC 値が得られたことは、血漿 *C*-Man-Trp の卵巣腫瘍診断における疾患マーカーとしての可能性が示唆される。また、腎障害による尿中 *C*-Man-Trp の増加は複数の研究グループから報告されている^{16, 17)}。腎機能の指標であるクレアチニンの量は筋肉量に影響を受けることが知られているが、*C*-Man-Trp は筋肉量の影響を受けない点が優れている。さらに、タンパク質品質管理機構と *C*-マンノシル化との関連も示唆されている¹⁸⁾。

オートファジーによる *C*-マンノシル化タンパク質の分解が、細胞内 *C*-Man-Trp の生成機構の一因だと推察されている。培養細胞を栄養飢餓状態にし、オートファジーを誘導させたところ、細胞内 *C*-Man-Trp 濃度が有意に上昇することが、複数の細胞株で確認できた。また、ラパマイシンによるオートファジー誘導においても、細胞内 *C*-Man-Trp 濃度の上昇が見られた¹⁹⁾。バクテリアの一種である Sphingomonadaceae family は、*C*-Man-Trp を炭素源として増殖することから、Sphingomonadaceae 内に *C*-Man-Trp を代謝分解する酵素が存在することが示唆されている²⁰⁾。これらは合成した *C*-Man-Trp を基盤として行われた共同研究の結果であり、有機合成化学による化合物供給が生化学研究に威力を示した例といえる。

別の研究グループからの報告では、*C. elegans* 内の *Dpy-19* が *C*-マンノシル化酵素に関わる遺伝子群として同定された²¹⁾。その後、哺乳類においては DPY19L1 や DPU19L3 が *C*-マンノシルトランスフェラーゼとして同定された^{22, 23)}。今後、これらの生合成関連酵素に対する阻害剤探索などのケミカルバイオロジー研究も期待される。

3. エンド開裂反応の存在についての議論：歴史的背景

Emil Fischer が初のグリコシル化反応を報告して以来²⁴⁾、これまでグリコシル化反応では、糖供与体を活性化して生じた環状カチオンに糖受容体を反応させてグ

リコシド結合を形成してきた (Fig. 3)。環状カチオンは、有機合成化学によるフラスコの中でのグリコシル化反応のみならず、動物や植物の中での糖鎖の生合成や分解過程においての中間体としても関与している。この環外酸素とアノマー炭素の結合が開裂する切断モードは、エキソ開裂反応とよばれる。一方、グリコシドは、非対称アセタール構造なので、環内酸素とアノマー炭素の間の結合が切断されても然るべきはずである。この開裂様式をエンド開裂反応と呼ぶ。エンド開裂反応は、これまでグライコサイエンスにおいて注目されることは少なかった。

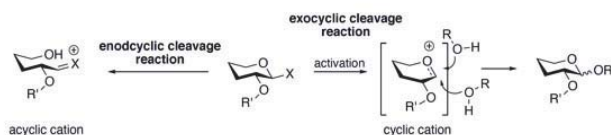


Fig 3. エンド開裂反応とエキソ開裂反応

エンド開裂反応は、糖加水分解酵素リゾチームと基質の *N*-結合型糖鎖の X 線結晶構造解析において、*N*-アセチルグルコサミンの構造が椅子型配座を保っていることから、1986年に Karplus がその存在を提唱したことによる^{25, 26)}。椅子型配座を持つピラノシドがエンド開裂するという仮説は立体電子効果論を背景とする。アセタール加水分解においては、切断される炭素—酸素結合と反対側の酸素原子の孤立電子対の電子の流れ込みが駆動力となり、酸素の孤立電子対が、切断される C-O 結合とアンチペリプラナーとなる配座が望ましい (Fig.4a)。α-グリコシドは、立体電子効果論を満たしており、加水分解されることが支持できる (Fig. 4b)。一方、β-グリコシドでは椅子型配座を保ったままでは環内酸素の孤立電子対からの電子の流れ込みがおきないため、加水分解されることは理論的には困難となる (Fig. 4c)。しかし、実際には、α-グリコシドも β-グリコシドもほぼ同様に加水分解される。理論と実験は一見矛盾しているように見えるが、ピラノシドの配座が椅子型配座のみをとるので

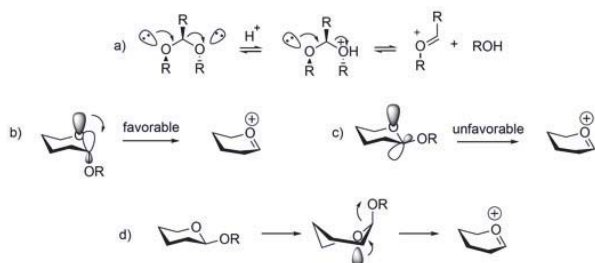


Fig. 4 a) 立体電子効果論からのアセタール加水分解機構；b) 環内酸素孤立電子対からの電子の流れ込みが可能であるα-グリコシドの加水分解機構；c) 環内酸素孤立電子対からの電子の流れ込みが難しいβ-グリコシドの加水分解；d) ピラノシド配座変換による環内酸素孤立電子対からの電子の流れ込みが可能な配座からのβ-グリコシドの加水分解

はなく、フレキシブルに変化して環内酸素の孤立電子対からの電子の流れ込みが可能な配座をとることから矛盾なく説明できる (Fig. 4d)。

Karplus の仮説に触発され、エンド開裂反応を証明するために、エンド開裂反応により生じる鎖状カチオンを捕捉する試みが行われた。立体電子効果論を背景として、椅子型配座に固定した糖アナログを基質として、鎖状カチオンを捕捉した例が数例報告されている^{27, 28)}。しかしながら、エンド開裂には室温程度の温度が必要であることや、エキソ開裂反応と比較するとその割合が小さいことなどから、それ以上の発展はなされなかった。

4. 実験化学によるエンド開裂の証拠の提示

我々は、アミノ糖の 1,2-*cis* (α) 選択的グリコシル化反応を開拓していく上で、*N*-benzyl-2,3-*trans* カーバメート基を持つピラノシドが容易に 1,2-*trans* (β) 体から 1,2-*cis* (α) 体へと異性化することを見出した。我々は、この理由がエンド開裂反応によるものと推測し、鎖状カチオンを還元や分子内 Friedel-Crafts 反応により捕捉することで、エンド開裂が存在する明らかな証拠を示した (Fig.5)²⁹⁾。我々の系では、これまでの報告例とは異なり、-30℃ 程度の低温においてもエンド開裂反応が起こる。

さらに異性化反応を加速する反応条件の探索を行った。まず、カーバメート上の置換基を系統的に変化させた。アルキル基の場合にはα体が主生成物になるものの、β体もかなりの割合で存在する。一方、アシル基で置換すると、ほぼ完全にα体のみを得ることができた。アシル基の中でもアセチル基が最も有効である³⁰⁾。また、この結果は多くの基質に対して有効であり、顕著な溶媒効果がみられ、とくにアセトニトリル中では 1 分以内で反応がほぼ完結した³¹⁾。すなわち、β体から高い立体選択性でα体へと構造変換できることを意味する。

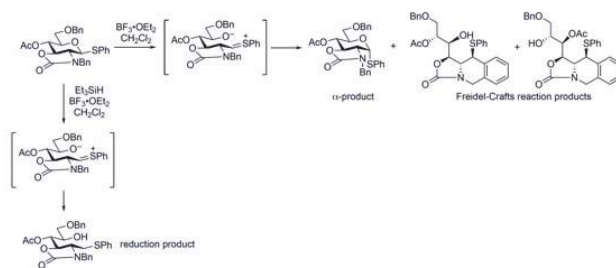


Fig. 5 鎖状カチオン捕捉によるエンド開裂反応の存在の証明：a) 鎖状カチオンの還元；b) 鎖状カチオンとベンジル基内ベンゼン環との Friedel-Crafts 反応生成物

5. エンド開裂反応の合成化学への展開：立体選択的 1,2-*cis* 選択的アミノグリコシドの構築による mycothiol の合成

この事実、エンド開裂が合成化学的観点から非常に

有用であることを意味する。1,2-*trans* グリコシドの立体選択的合成は、2 位にアシル基を導入することで、隣接基効果により容易に行うことができる。一方、1,2-*cis* グリコシドの立体選択的合成は、いまだ解決されておらず³²⁾、立体選択性の発現には反応条件や糖供与体の構造の組み合わせによる多大な試行錯誤を要する。特に 2 位にアミノ基を持つ糖の 1,2-*cis* グリコシル化での糖供与体としては、実質的には 2 位のアミノ基をアジド基として保護したアジド糖しか選択肢がない^{33, 34)}。アジド糖を糖供与体とした場合においても、グリコシル化反応においての十分な立体選択性が担保されるわけではない³⁵⁾。生理活性を持つ糖鎖には、ヘパリン、抗生物質など 1,2-*cis* アミノ糖を持つものが多い。これらの糖鎖を合成する上では立体選択的合成が必須であり、1,2-*cis* アミノ糖の選択的合成法の開発が望まれる。

エンド開裂の合成的有用性を示すために、抗結核治療薬開発の鍵物質と期待される mycothiol の合成を行った。Mycothiol はイノシトールに D-グルコサミンが 1,2-*cis* 結合しており、さらにアミノ基にシステインが結合する構造を持つ³⁶⁾。結核は、世界では感染症死因の 2 位を占める。広範囲薬剤耐性結核菌や完全薬剤耐性結核菌も存在しており、新しい抗結核薬の開発が必要となっている。ヒトでは、グルタチオンが体内の酸化還元調節や解毒に関わるが、結核菌では、グルタチオンの代わりに mycothiol がその役割を果たす。結核菌に存在し、ヒトには存在しない mycothiol は抗結核薬開発のターゲットと考えられている。光学分割したイノシトールにフタルイミド基で保護したグルコサミンを用いて、1,2-*trans* グリコシドを構築した。その後、フタルイミドを除去し、*N*-アセチル 2,3-*trans* カーバメート基を導入した。BF₃・OEt₂ を用いての異性化、ベンジル基の除去、システインの導入を経て、mycothiol を得た (Fig.6)。

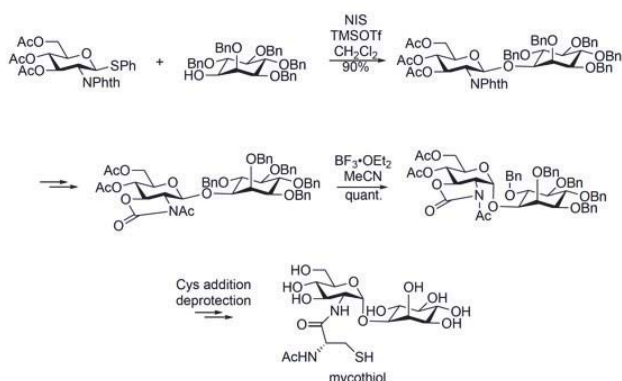


Fig. 6 エンド開裂反応を用いた mycothiol の合成

6. 合成 mycothiol を用いた抗菌剤 Fosfomycin 耐性機構の解明

エポキシド基を持つ Fosfomycin は古くから用いられている抗菌剤である。細菌が Fosfomycin への耐性を持つ機構として、Fosfomycin resistance enzymes (Fos) の誘導が明らかになっている。Fosfomycin resistance enzymes に属する FosA や FosB は、Mn²⁺ のような二価イオン存在下、グルタチオンやシステインのスルフヒドリル基の Fosfomycin のエポキシドへの付加を触媒し、Fosfomycin の活性を失わせることが知られている (Fig.7)。最近見出された Fosfomycin resistance enzymes のひとつである FosM についても mycothiol のスルフヒドリル基の Fosfomycin への付加であることが提唱されていた。しかし、Fosfomycin のエポキシド基に Mn²⁺ 存在下、スルフヒドリル基ではなく、水が付加することを合成した mycothiol を用いて明らかにした³⁷⁾。この知見は、今後の結核菌の薬剤耐性メカニズムの理解の一助となることが期待される。

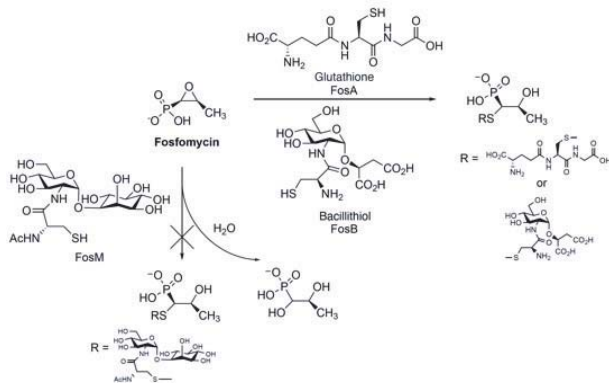


Fig. 7 抗菌剤 Fosfomycin 耐性機構; mycothiol は、グルタチオンや Bacillithiol とは異なり、Fosfomycin のエポキシド基に付加しない。

7. 細菌表層糖鎖に含まれる糖鎖のエンド開裂による糖鎖合成に向けて

細菌表層には、ヒトには含まれない糖構造が存在しており、糖鎖合成により、均一な糖鎖構造の供給によるワクチン開発も期待されている。2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy- α -D-galactopyranoside (AAT) は、細菌表層に含まれ、ヒトには含まれない糖構造のひとつである (Fig.8)³⁸⁾。AAT は、多くの場合、1,2-*cis* 結合しているが、ATT の 1,2-*cis* 選択的合成にエンド開裂反応がこの系にも適用できる端緒を得ている³⁹⁾。

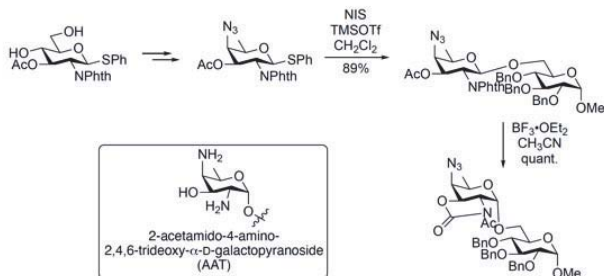


Fig 8. エンド開裂反応による細菌表層に含まれる 1,2-*cis* AAT の合成

8. エンド開裂反応によるアノマー位立体配置一挙変換反応

通常のグリコシル化反応では、アノマー位の立体配置の制御は、糖受容体と糖供与体でのグリコシル化反応により結合が生じるときに行われてきた。1回のグリコシル化反応で1つのアノマー炭素の立体配置が決定される。しかし、エンド開裂を経由した異性化反応を用いれば、複数の既存の β -グリコシドを α -グリコシドへと変換可能である。この概念立証実験のために、我々は β -グリコシドの4糖を合成した。フタルイミド基を除去し、*N*-acetyl-2,3-*trans* カーバメート基を導入した。その後、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ により全てのアノマー炭素の立体配置を変換した (Fig.9)。すなわち、4箇所の β -グリコシドを一挙に α -グリコシドへと変換できた。複数の既存のグリコシドの立体配置の一挙変換は、これまでのグリコシル化反応では、不可能な変換反応であり、エンド開裂反応の特長である。エンド開裂反応によるグリコシド立体制御の新しい概念を示すことができた。

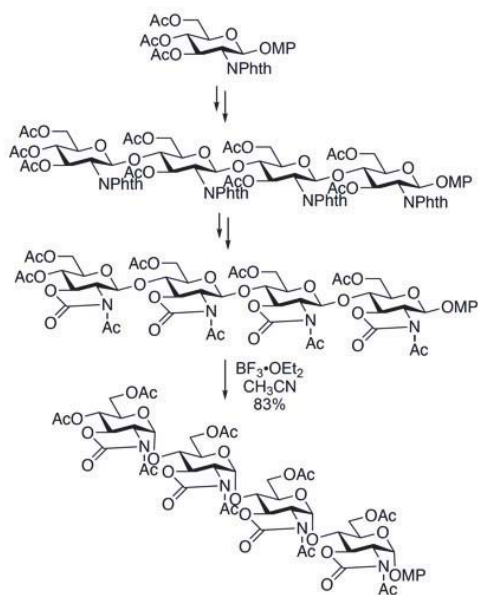


Fig. 9 複数の既存グリコシド立体配置の一挙変換

9. エンド開裂反応のドライビング・フォース

当初、我々も立体電子効果論に鑑み、2,3-*trans* カーバメートによるピラノシドが椅子型配座に固定されたため、エンド開裂反応が起こりやすくなったと考えていた。しかしながら、B3LYP/6-31G(d,p) レベルの密度汎関数理論計算では、2,3-*trans* カーバメート基の導入により、ピラノシドと5員環それぞれに歪みが生じて基質のエネルギー準位を押し上げることがドライビング・フォースであることが明らかになった⁴⁰⁾。様々な構造の基質の計算結果と実験値は非常に一致を示している。我々の系では、立体電子効果の影響は、二次的なものと考えている。

エンド開裂についてはこれまで合成化学的に着目されてこなかったが、我々の報告と時を同じくして、エンド開裂反応を経由した異性化反応が報告されるようになった。例えば、Murphy らは、グルクロン酸の保護体が SnCl_4 や TiCl_4 などの強ルイス酸により異性化することを報告している⁴¹⁾ (Fig.10)。また、Nifantiv らは、硫酸基を持つピラノシドが異性化を経て、フラノシドに異性化することを報告している⁴²⁾。

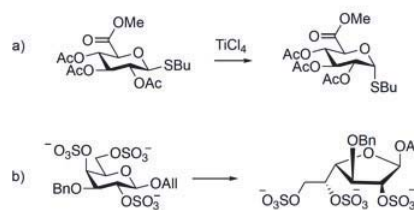


Fig. 10 他グループからのエンド開裂を経由する反応: a) Murphy らによるグルクロン酸の TiCl_4 による異性化反応; b) 硫酸化糖ピラノシドのフラノシドへの変換反応

10. 抗体糖鎖改変と均一構造の抗体—薬物複合体の合成

タンパク質の糖鎖は、その微細構造が少しずつ異なった糖鎖が結合しており、タンパク質の体内動態や機能に影響を及ぼしていることが知られている。一方で、均一な構造を持つ糖タンパク質の調製が困難であるために、糖鎖構造と糖タンパク質の明確な構造活性相関がなされない。完全化学合成した糖タンパク質として、エリスロポエチンの例が挙げられるが^{43, 44)}、エリスロポエチンは、アミノ酸の数が165個であり、タンパク質としては比較的小さい。大きな分子量を持つ均一な糖タンパク質の合成は未だ困難である。

抗体—薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) は、抗体に殺細胞効果が非常に強い低分子化合物をリンカーを介して結合させた化合物であり、次世代抗体医薬品としての期待が高い⁴⁵⁾。EPR 効果⁴⁶⁾ によりがん新生血管から漏れ出た ADC が、標的細胞表面の抗原に結合し、細

胞の中で薬物を放出して、薬効を示し、低分子化合物の治療域を拡大する。臨床応用された ADC は2018年では2例であったが、2021年3月の段階では9例となっている。

抗体への薬物結合位置や数により、多種多様な ADC の化学種が生成される。薬物結合位置により ADC の安定性が異なる報告があり⁴⁷⁾、また、合成の再現性の観点からも ADC 合成においても均一合成が望まれている。

N-結合型糖鎖の還元末端キトビオースの間を切断するエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) と加水分解能力を抑えたその改変体を組み合わせて糖鎖改変を行い、均一糖鎖構造を持つ抗体を作製できる⁴⁸⁾。我々は、糖鎖に薬物付加可能な官能基としてアジド基を用いた糖鎖を用いて⁴⁹⁾、ENGase とその改変体によりトラスツマブの糖鎖構造を均一化しつつ、糖鎖部位にのみアジドを結合した。さらに、アジド基と歪んだアルキンとの反応により、抗体 Fc 領域に存在する1対の N-結合型糖鎖にリンカー付き薬物を結合した⁵⁰⁾。合成した ADC の構造均一性は MS やペプチドマッピングにより、1抗体あたりに4つのリンカー付き薬物が結合していること、さらに、ADC 全体の構造が均一化されていることを確認した。さらに *in vitro* でトラスツマブの抗原である HER2 高発現細胞株である N-87, OE-19、および SK-BR-3 には効果を発揮したが、一方、HER2 低発現細胞株の MKN-45 および MCF-7 には効果がない、DDS 製剤としての期待通りの活性を示した。

おわりに

有機合成化学は、この数十年の間に非常に進展したが、

今後異分野との連携により益々発展することが期待される。糖化学においては、立体電子効果などの有機化学の主要な概念も含まれるが、基礎化学としても重要である。また、巨大分子である糖タンパク質の均一合成は、生化学研究のみならず、構造生物学にも寄与すると期待される。有機合成化学の持つ強みである均一化合物の合成、および、系統的合成は、グライコサイエンスに大きく貢献するにちがいない。

謝辞

本稿の執筆の機会を与えてくださいました星薬科大学星薬科大学出版・刊行物委員会委員長小林恒雄先生、副委員長(紀要編集長)小幡誉子先生に感謝申し上げます。

本稿は、著者のこれまでの成果の一部をまとめたものであり、伊藤幸成理化学研究所元主任研究員、エンド開裂反応を見出した、現糖鎖工学研究所石井一之博士研究員をはじめとする共同研究者の皆様に感謝いたします。C-Man-Trp に関する研究は、和歌山県立医科大学井原義人先生との共同研究の成果です。抗体糖鎖改変 ADC では、東北医科薬科大学山口芳樹先生、株式会社伏見製薬所須田稔博士、木下崇司博士、日本ウオーターズ株式会社廣瀬賢治博士、国立がん研究センター安永正浩先生、松村保広先生にお世話になりました。ここに深く感謝いたします。

【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) van Kooyk, Y., Rabinovich, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **9**, 593-601 (2008).
- 2) Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J. Clin. Pathol.* **62**, 322-329 (2010).
- 3) Moremen, K. W., Tiemeyer, M., Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 448-462 (2012).
- 4) Stowell, S. R., Ju, T., Cummings, R. D. Protein glycosylation in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **10**, 473-510 (2015).
- 5) Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 6802-6818 (2006).
- 6) Hofsteenge, J., Müller, D. R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W. J., Vliegthart, J. F. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U. *Biochemistry* **33**, 13524-13530 (1994).
- 7) Ihara Y., Inai Y., and Ikezaki M. Protein C-mannosylation and its prospective functions in the cell. *Trends Glycosci. Glycotech.*, **23**, 1-13 (2011).
- 8) Krieg, J., Hartmann, S., Vicentini, A., Gläser, W., Hess, D., Hofsteenge, J. Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 301-309 (1998).
- 9) Julenius, K. NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites. *Glycobiology* **17**, 868-876 (2007).
- 10) Doucey, M. A., Hess, D., Cacan, R., Hofsteenge, J. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 291-300 (1998).
- 11) Manabe, S., Ito, Y. Total synthesis of novel subclass of glyco-amino acid; C₂-α-D-C-Mannosylpyranosyl-L-tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9754-9755 (1999).

- 12) Nishikawa, T., Ishikawa, M., Isobe, M. Synthesis of a α -mannosyltryptophan derivative, naturally occurring C-glycosyl amino acid found in human ribonuclease. *Synlett* **1999**, 123-125 (1999).
- 13) Sakurai, S., Inai, Y., Minakata, S., Manabe, S., Ito, Y., Ihara, Y. A novel assay for detection and quantification of C-mannosyl tryptophan in normal or diabetic mice. *Sci. Rep.* **9**, 4675 (2019).
- 14) Iwahashi, N., Inai, Y., Minakata, S., Sakurai, S., Manabe, S., Ito, Y., Ino, K., Ihara, Y. C-Mannosyl tryptophan increases in the plasma of ovarian cancer. *Oncol. Lett.* **19**, 908-919 (2020).
- 15) Sakurai, S., Inai, Y., Minakata, S., Manabe, S., Ito, Y., Ihara, Y. Detection and quantification of C-mannosyl tryptophan in tissues and plasma of mice: Implication for diabetes. *Sci. Rep.* **9**, 4675 (2019).
- 16) Yonemura, K., Takahira, R., Yonekawa, O., Wada, N., Hisada, A. The diagnostic value of serum concentrations of 1-(α -mannopyranosyl)-L-tryptophan for normal renal function. *Kidney Int.* **65**, 1395-1399 (2004).
- 17) Sekula, P., Gock, O. N., Quayle, L., Barrios, C., Levey, A. S., Römisch-Margl, W., Menni, C., Yet, I., Gieger, C., Inker, L. A., Adamski, J., Gronwald, W., Illig, T., Dettmer, K., Krumsiek, J., Oefner, P. J., Valdes, A. M., Meisinger, C., Coresh, J., Spector, T. D., Mohny, R. P., Suhre, K., Kastenmüller, G., Köttgen, A., A metabolome-wide association study of kidney function and disease in the general population. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 1175-1188 (2016).
- 18) Shcherbakova, A., Preller, M., Taft, M. H., Pujols, J., Ventura, S., Tiemann, B., Buettner, F. F. R., Bakker, H. C-mannosylation supports folding and enhances stability of thrombospondin repeats. *eLife* **8**, e52978 (2019).
- 19) Minakata, S., Inai, Y., Manabe, S., Nishitsuji, K., Ito, Y., Ihara, Y. Monomeric C-mannosyl tryptophan is a degradation product of autophagy in cultured cells. *Glycoconj. J.* **37**, 635-645 (2020).
- 20) Hossain, T. J., Manabe, S., Ito, Y., Iida, T., Kosono, S., Ueda, K., Hosomi, A., Inoue, D., Suzuki, T. Enrichment and characterization of a bacterial mixture capable of utilizing C-mannosyl tryptophan as a carbon source. *Glycoconj. J.* **35**, 165-176 (2018).
- 21) Buettner, F. F. R., Ashikov, A., Tiemann, B., Lehle, L., Bakker, H. C. *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol. Cell.* **50**, 295-302 (2013).
- 22) Shcherbakova, A., Tiemann, B., Buettner, F. F. R., Bakker, H. Distinct C-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1 repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 2574-2579 (2017).
- 23) Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Simizu, S.: Identification of DPY19L3 as the C-mannosyltransferase of R-spondin1 in human cells. *Mol. Biol. Cell.* **27**, 744-756 (2016).
- 24) Fischer, E. Ueber die glucoside der alkohole. *Chem. Ber.* **26**, 2400 (1853).
- 25) Post, C. B., Karplus, M. Does lysozyme follow the lysozyme pathway? An alternative based on dynamic, structural, and stereoelectronic considerations. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1317-1319 (1986).
- 26) 後日、リゾチームと基質糖鎖の X 線構造解析において N-アセチルグルコサミンの配座が歪んでいる例が複数報告され、リゾチームについての糖鎖のエンド開裂の可能性は、否定されている。
- 27) Gupta, R. B., Frank, R. W. Direct experimental evidence for cleavage of both exo- and endo-cyclic carbon-oxygen bonds in the acid-catalyzed reaction of alkyl .beta.-tetrahydropyranyl acetals. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 6554-6556 (1987).
- 28) Liras, J. L., Anslyn, E. V. Exocyclic and endocyclic cleavage of pyranosides in both methanol and water detected by a novel probe. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2645-2646 (1994).
- 29) Manabe, S., Ishii, K., Hashizume, D., Koshino, H., Ito, Y. Evidence for endocyclic cleavage of conformationally restricted glycopyranosides. *Chem. Eur. J.* **15**, 6894-6901 (2009).
- 30) Manabe, S., Satoh, H., Hutter, J., Lüthi, H. P., Laino, T., Ito, Y. Significant substituent effect on the anomerization of pyranosides: Mechanism of anomerization and synthesis of a 1,2-*cis* glucosamine oligomer from the 1,2-*trans* anomer. *Chem. Eur. J.* **20**, 124-132 (2014).
- 31) Manabe, S., Ito, Y. Significant solvent effect in anomerization reaction of pyranosides. *Tetrahedron Lett.* **50**, 4827-4829 (2009).
- 32) Manabe, S. Recent development of stereoselective glycosylation reactions. *Heterocycles*, **102**, 177-210 (2021).
- 33) Lemieux, R. U., Ratcliffe, R. M. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. *Can. J. Chem.* **57**, 1244-1251 (1991).
- 34) Paulsen, H., Kalar, C., Stenzel, W. *Chem. Ber.* **111**, 2358-2369 (1978).
- 35) Ngoje, G., Li, Z. Study of the stereoselectivity of 2-azido-2-deoxyglucosyl donors: protecting group effects. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 1879-1886 (2013).
- 36) Manabe, S., Ito, Y. Mycothiol synthesis by anomerization reaction via endocyclic cleavage. *Beilstein J. Org. Chem.* **12**, 328-333 (2016).
- 37) Travis, S., Shay, M. R., Manabe, S., Gilbert, N. C., Frantom, P., Thompson, M. K. Characterization of the genomically encoded fosfomycin resistance enzyme from *Mycobacterium abscessus*. *Med. Chem. Commun.* **10**, 1948-1957 (2019).
- 38) Lindberg, B., Lindqvist, B., Lönngrén, J., Powell, D. A., Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Carbohydr. Res.* **78**, 111-117 (1980).
- 39) Manabe, S., Ito, Y. 1,2-*cis*-selective formation of a unique amino-containing amino glycoside by endocyclic cleavage strategy. *Heterocycles*, **99**, 1304-1314 (2019).
- 40) Satoh, H., Manabe, S., Ito, Y., Lüthi, H. P., Laino, T., Hutter, J. Endocyclic cleavage in glycosides with 2,3-*trans* cyclic protecting groups. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 5610-5619 (2011).
- 41) Pilgrim, W., P. V. Murphy. SnCl₄- and TiCl₄-Catalyzed anomerization of acylated O- and S-glycosides: Analysis of factors that lead to higher α : β anomer ratios and reaction rates. *J. Org. Chem.* **75**, 6747-6755 (2010).
- 42) Krylov, V. B., Argunov, D. A., Vinnitskiy, D. Z., Verkhnyatskaya, S. A., Gerbst, A. G., Ustyuzhanina, N. E., Dmitrenok, A. S., Huebner, J., Holst, O., Siebert, H.-C., Nifantiev, N. Pyranoside \rightarrow furanoside rearrangement: New reaction in carbohydrate chemistry and its application in oligosaccharide synthesis. *Chem. Eur. J.* **20**, 16516-16522 (2014).

- 43) Wang, P., Dong, S., Shieh, J.-H., Peguero, E., Hendrickson, R., Moore, M. A. S., Danishefsky, S. J. Erythropoietin derived by chemical synthesis, *Science*, **342**, 1357-1360 (2013).
- 44) Murakami, M., Kiuchi, T., Nishihara, M., Tezuka, K., Okamoto, R., Izumi M., Kajihara, Y. Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity. *Sci. Adv.* **2**, e1500678 (2016).
- 45) Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Disc.* **16**, 315-337 (2017).
- 46) Matsumura, Y., Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387-6392 (1986).
- 47) Shen, B.-Q., Xu, K., Liu, L., Raab, H., Bhakta, S., Kenrick, M., Parsons-Reponte, K. L., Tien J., Yu, S.-F., Mai, E., Li, D., Tibbitts, J., Baudys, J., Saad, O. M., Scales, S. J., McDonard, P. J., Hass, P. E., Eigenbrot, C., Nguyen, T., Solis, W. A., Fuji, R. N., Flagella, K. M., Patel, D., Spencer, S. D., Khawli, L. A., Ebens, A., Wong, W. L., Vandlen, R., Kaur, S., Sliwkowski, M. X., Scheller, R. H., Polakis, P., Junutula, J. R. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat. Biotech.* **30**, 184-189 (2012).
- 48) Wang, L.-X., Tong, X., Li, C., Giddens, J. P., Li, T. Glycoengineering of antibodies for modulating functions. *Annu. Rev. Biochem.* **88**, 433-459 (2019).
- 49) Manabe, S., Abe, J. Ito, Y. Amide bond formation of sialic acid in oligosaccharide without protecting group. *Heterocycles*, **97**, 1203-1209 (2018).
- 50) Manabe, S. Yamaguchi, Y., Matsumoto, K., Fuchigami, H., Kawase, T., Hirose, K., Mitani, A., Sumiyoshi, W., Kinoshita, T., Abe, J., Yasunaga, M., Matsumura, Y., Ito, Y. Characterization of antibody products obtained through enzymatic and non-enzymatic glycosylation reactions with a glycan oxazoline and preparation of homogeneous antibody-drug conjugate via Fc *N*-glycan. *Bioconj. Chem.* **30**, 1343-1355 (2019).

Glycochemistry reveals biological functions of glycoconjugates

Shino MANABE

Laboratory of Functional Molecule Chemistry, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University

Glycoconjugates play important biological roles and related to diseases. Synthetic organic chemistry can provide homogenous glycosides and glycoconjugates. Herein, results of our research are briefly described for 1) the chemical synthesis of a novel post-translational modification, C-mannosyl tryptophan, and an investigation of its bioactivity using synthetic probes; 2) the identification of an endocyclic cleavage reaction and its application in stereoselective 1,2-*cis* glycoside synthesis; and 3) the preparation of a homogeneous antibody-drug conjugate via a glycan conjugate using endo- β -*N*-acetylglucosaminidase.